Observation et conservation des très petits Arthropodes

Par F. Grandjean.

Cette note expose brièvement les procédés qu'une expérience déjà longue m'a conduit à adopter pour l'étude morphologique et la conservation des Acariens, c'est-à-dire d'Arthropodes dont la taille est habituellement comprise entre 1 mm. et 1/10 mm. Par étude morphologique, j'entends celle des formes extérieures et plus spécialement des organes chitineux. Il n'est pas question d'anatomie interne ou de cytologie. Je pars d'animaux immergés dans l'alcool éthylique à 75° et morts par immersion dans ce liquide.

I. Observation de l'animal entier, dans l'air, en lumière réfléchie.

La loupe ne grossit pas assez. Le microscope binoculaire à paires d'objectifs, dit à dissection, donne d'excellents résultats jusqu'à × 60 ou × 100, pourvu que trois conditions soient réalisées : l'animal doit rester imbibé d'alcool pendant toute la durée de l'observation ; il doit reposer sur fond noir ; il doit être éclairé fortement par une source aussi large que possible (lumière très diffuse).

Sous le microscope et sur la table de travail, ou la platine, on dispose un bloc *B* de charbon poreux dont la face supérieure *S* est plane et finement dépolie (fig. 1). Cette face est parallèle à la face inférieure I du même bloc afin que l'on puisse déplacer le bloc à la main sans cesser d'être au point sur *S*. Un siphon capillaire déverse en un point *A* de *S* le contenu d'un petit réservoir *R* posé sur *S* et plein d'alcool à 75°. Autour de *A*, tant que *R* n'est pas vide, le charbon est saturé d'alcool jusqu'à une certaine profondeur. Dans la zone de saturation sa surface est plus noire que si elle était sèche et son pouvoir réfléchissant presque nul. La position de *A* est à choisir près du bord antérieur du charbon et on la change si cela est nécessaire.

L'animal est déposé en *A*, dans l'alcool qui sort du siphon. Pour l'observer, on l'écarte un peu de *A*, ou l'on écarte un peu *A* de lui. Dans sa nouvelle situation *A*' (fig. 2), il ne touche plus le liquide, mais il repose sur un substratum imbibé et il est entouré d'une atmosphère quasi saturée par la vapeur d'alcool. Il ne se dessèche pas et dès que l'alcool qui recouvrait sa surface s'est évaporé il se

trouve dans une condition favorable à l'examen. En le touchant avec l'extrémité d'un pinceau très fin on l'oriente à son gré, car il adhère légèrement au substratum. S'il manifeste la moindre tendance à se dessécher, on le ramène en *A* et on recommence.

La figure 1 montre une des plus simples manières de réaliser l'éclairage diffus. La source de lumière est le globe d'une ampoule E, en verre opale [1], qui est placée aussi près que possible du charbon. Comme elle chauffe, la cuve d'absorption *C*, pleine, d'eau, est nécessaire. Les lentilles convergentes *L* ne le sont pas. Elles améliorent cependant l'éclairage à condition d'être bien choisies. Elles sont représentées, dans mon installation, par un condensateur de microscope dont j'ai enlevé la lentille de front.

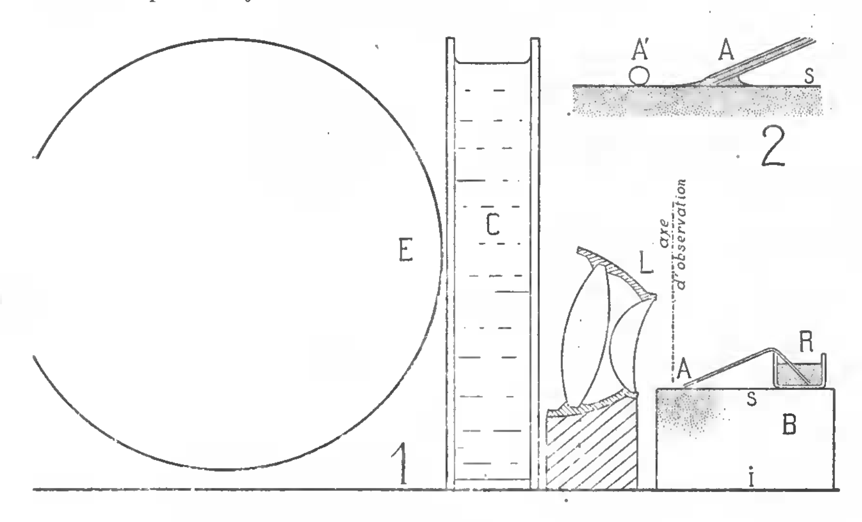


Fig. 1 et 2. — Dispositif d'éclairage par réflexion sur fond noir.

Le même dispositif convient au triage ou à n'importe quel examen rapide. On enlève *R* et son siphon puis on répand sur *S*, en bordure de l'arête antérieure du bloc de charbon, l'alcool contenant les objets. Le liquide est vite absorbé et les objets restent sur le charbon mouillé. On a le temps de les trier avant qu'ils se dessèchent. Quand le triage est long on remouille avec de l'alcool.

Au microscope ordinaire, pour les forts grossissements en lumière réfléchie, la distance frontale de l'objectif étant petite, il faut avoir

1. Si l'ampoule est prévue survoltée et si elle est montée sur le réseau par l'intermédiaire d'un rhéostat, on pourra faire varier beaucoup son éclat et rendre celui-ci considérable. Ce perfectionnement est très utile mais on s'aperçoit vite qu'un éclairage plus intense n'a d'intérêt que dans la mesure où il n'augmente pas, en même temps, la quantité de lumière parasite diffusée par le fond noir.

recours, dans l'état actuel de la construction des microscopes, à l'illuminateur vertical. Ce moyen d'éclairage ne m'a paru convenir qu'à des cas particuliers.

II. Observation par transparence, dans un milieu optiquement favorable, de l'animal entier ou disséqué.

Traitement de l'objet a observer. — Il faut d'abord dégraisser et rendre aussi transparent que possible.

Si l'animal est depuis longtemps dans l'alcool, sa graisse est dissoute. Sinon je le mets dans l'acétate d'éthyle pendant quelques minutes ou quelques heures, puis je reviens à l'alcool.

Au sortir de l'alcool l'animal est immergé dans l'acide lactique sur une lame (porte-objet) à concavité profonde. L'alcool s'en va et l'acide lactique le remplace. Il y d'abord contraction, puis gonflement et diminution de l'opacité. Pour éclaircir davantage on chauffe. L'acide lactique suffisamment chaud dissout les tissus, sauf la graisse et la chitine. Celle-ci, bien qu'elle ne change pas d'aspect, ou guère, devient plus souple et c'est un avantage que l'on appréciera dans la suite des manipulations. La durée du chauffage et sa température sont une affaire d'expérience. La température d'ébullition de l'acide lactique n'est pas exclue.

Avant leur dissolution complète les tissus s'altèrent, gonflent et deviennent apparemment homogènes dans leur ensemble. A ce stade l'animal, qui est déjà fortement éclairci, est soumis à une pression intérieure qui met tous ses organes en extension. La pression est même parfois si élevée que la cuticule se déchire. Pour éviter cet accident il faut couper l'animal en deux avant de le chauffer ou le perforer d'avance à un ou plusieurs endroits, lesquels, naturellement, sont choisis de telles manières que les observations ultérieures ne soient pas gênées.

Après le chauffage vient la dissection, s'il y a lieu. On opère sur la même lame à concavité, dans le même acide lactique. Disséquer avant chauffage est moins facile et n'est préférable que dans certains cas.

Observation par transparence au microscope de dissection. — Toujours dans les mêmes conditions, mais plutôt après avoir remplacé le vieil acide chauffé par du frais, l'objet, c'est-à-dire l'animal ou une de ses parties, est examiné au grossissement 60 ou 100. Avec une aiguille on le déplace et on le fait tourner, afin de le voir dans tous les sens. La surface du liquide est libre.

Quelquefois, à cause des ménisques de cette surface (l'aiguille de manipulation en provoque toujours un) et du trouble apporté par

eux aux images, il est nécessaire de poser sur le liquide une lamelle qui le recouvre à moitié (fig. 4). L'objet est alors amené sous cette lamelle avec l'aiguille (qui est courhe) et on change son orientation presque aussi facilement que si la surface était partout découverte.

Mise en place et orientation de l'objet pour l'observation par transparence a fort grossissement. — A fort grossissement les observations ordinaires par transparence exigent que l'objet soit monté entre lame et lamelle. Malgré la lamelle il faut pouvoir orienter ce que l'on étudie et en changer l'orientation. Quant au milieu il doit être non contractant, non volatil et à faible réfringence, de sorte que l'acide lactique se recommande encore à nous pour cet emploi. J'ai essayé la plupart des autres liquides qui servent

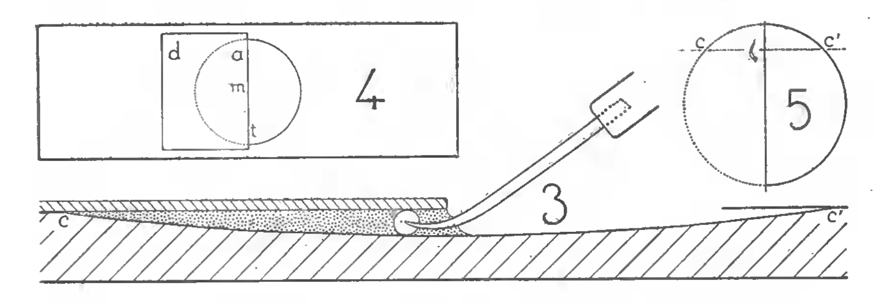


Fig. 3, 4 et 5. — Montage en préparation ouverte, laissant libre accès à l'objet que l'on étudie.

de milieux d'observation. L'acide lactique est le meilleur. Après lui je place, dans l'ordre de mes préférences, le lactophénol d'Amann.

La lame est à concavité. On la choisit selon la taille de l'objet. Il faut avoir toute une gamme de concavités, leurs profondeurs allant, par exemple, de 0,2 à 1,5 mm.

La lamelle est rectangulaire ou carrée. On la place comme l'indique la figure 4, sur une moitié de la concavité, puis on met en *t* de l'acide lactique, en quantité juste suffisante pour remplir par capillarité tout l'espace entre lame et lamelle.

Cette préparation vide étant portée sous un microscope à dissection éclairé par transparence, l'objet est introduit en *m*, dans l'acide lactique, à l'endroit de plus grande profondeur, puis poussé vers *a* parallèlement au bord de la lamelle jusqu'à ce qu'il touche les deux surfaces entre lesquelles il est compris. Il s'arrête plus ou moins loin du bord de la concavité selon qu'il est plus ou moins gros. On l'oriente en même temps, puis on le coince très légèrement. Une coupe verticale *cc'* à son niveau (fig. 5) donnerait la figure 3.

La préparation est terminée. Elle est ouverte. L'objet restant

accessible, on peut le ramener en *m* après examen, puis le disposer, en opérant comme la première fois, dans une autre orientation, ou l'enlever, lui faire subir un nouveau traitement, le réintroduire sous la lamelle, etc.

Pour déplacer l'objet j'emploie une aiguille très fine, emmanchée, à laquelle je donne, près de sa pointe, une courbure convenable. Les plus fines aiguilles (ou épingles) du commerce sont celles dites « minuties », en acier, qui ont en moyenne 14 mm de long et une épaisseur, dans leur partie cylindrique, d'environ 160 µ. Neuves, elles sont trop épaisses, mais elles s'amincissent au cours de l'emploi, car l'acide lactique les dissout lentement.

Même alors et même près de sa pointe, l'aiguille a une épaisseur notable. Engagée sous la lamelle elle ne peut naturellement pas atteindre le bord de la concavité. Quand l'objet est très petit elle ne peut donc pas le pousser assez loin de *m* pour qu'il touche à la fois la lame et la lamelle. Dans ce cas je soulève légèrement la lamelle avec l'aiguille. L'objet est entraîné vers le bord de la concavité par le liquide et quand on laisse la lamelle revenir à sa place l'objet ne revient pas tout à fait à la sienne. On constate presque toujours qu'il s'est déplacé un peu dans la bonne direction. On recommence et on arrive par tâtonnement au double contact. Le tour de main s'acquiert assez vite.

Que le soulèvement de la lamelle soit nécessaire ou non, le procédé d'orientation directe par l'aiguille ne suffit pas toujours, car il est assez grossier. S'il faut faire un dessin bien symétrique, par exemple, ou comprendre une structure difficile, l'orientation de l'objet doit être perfectionnée par un déplacement horizontal de la lamelle. Un tel déplacement est efficace car l'objet n'est pas rigide et il touche la lamelle, de sorte qu'un frottement existe au contact. La seule difficulté est de savoir déplacer très peu la lamelle. J'emploie pour cela l'index gauche appuyé très légèrement en *d* (fig. 4). En tournant la préparation de 180° on pourrait se servir d'un doigt de la main droite. L'essentiel est de se servir toujours du même doigt afin qu'il devienne habile. L'usage apprend à affiner ses mouvements et permet d'obtenir plus ou moins vite, dans l'azimuth que l'on veut, des translations qui sont de l'ordre de 5 µ, et même moindres.

Discerner les petits défauts d'orientation n'est possible, cela va de soi, qu'à fort grossissement, dans l'examen au microscope ordinaire. Il faut donc faire alterner cette sorte d'examen avec les corrections par déplacement de la lamelle (ou par tout autre procédé) jusqu'à ce que l'exactitude du résultat soit estimée suffisante.

Observation par transparence a fort grossissement. — Maintenant nous sommes arrivés à l'observation principale ou au dessin à la chambre claire. La préparation ouverte est traitée comme

si elle était fermée, même en immersion, car l'huile d'immersion et l'acide lactique ne se mélangent pas.

On constate cependant que l'huile diffuse dans l'acide lactique, puis s'y condense en gouttelettes. Les gouttelettes augmentent peu à peu en nombre et en taille. Si elles se formaient très vite elles gêneraient beaucoup, mais elles laissent, heureusement, tout loisir d'observer et de dessiner, à condition que l'objet ne soit pas trop près du bord de la lamelle et que l'épaisseur de l'acide lactique, dans la préparation, soit faible. La deuxième condition est satifaite d'elle-même puisqu'on n'observe jamais, en immersion, que des objets très petits et qu'alors on a dû les préparer dans une concavité très peu profonde.

Dans les observations par transparence à fort grossissement, que la lumière soit ordinaire ou polarisée, il faut accorder à l'éclairage du microscope une importance capitale. Pour voir les détails, un objectif de grande ouverture numérique est nécessaire mais une grande ouverture numérique d'éclairage ne l'est pas moins.

La source, très petite (3 à 6 mm²) et aussi homogène que possible, doit avoir un éclat réglable. Son image *im* à travers la condensateur doit se former au voisinage immédiat du plan de mise au point. Son image *IM* à travers le microscope ne doit occuper qu'une faible partie du champ.

J'emploie comme source une ampoule ordinaire de 6 ou 8 volts à filament spiral, choisie parmi celles dont les spires sont le plus régulières et le plus serrées. Cette ampoule est montée sur le réseau par l'intermédiaire d'un transformateur et d'un rhéostat. Je la place habituellement à 60 cm du microscope. Il est quelquefois préférable, aux très forts grossissements, de l'éloigner davantage afin que *IM* ne soit pas trop grand. Aux faibles grossissements il faut la rapprocher pour que *IM* ne soit pas trop petit, trop ponctuel.

Le rhéostat est indispensable pour faire varier l'éclat de la source. Celui-ci doit être très faible dans l'observation courante, plus fort si l'objet est peu éclairci ou très coloré, intense quand on observe l'actinochitine en lumière polarisée. Dans ce dernier cas il faut diminuer fortement la résistance du rhéostat mais ne pas oublier, auparavant, de croiser les nicols, ou les lames polarisantes, sans quoi l'éclat de *IM* serait insoutenable à l'œil.

Le condensateur doit être aussi convergent que possible. Il n'a besoin d'aucun diaphragme. Appelons H sa distance à la préparation, mesurée n'importe comment, et plaçons-le d'abord dans la position H_0 qui donne à l'éclairage le maximum de convergence. Alors l'image *im* se forme exactement dans le plan de mise au point [1].

1. Il faut que ce soit possible. L'épaisseur de la lame porte-objet ne doit donc pas dépasser une certaine limite. Avec le condensateur aplanétique le plus fort habituellement employé (ouv. num. 1,4 dans l'huile), et compte tenu du défaut moyen de pla-

Déplaçons ensuite un peu le condensateur, soit en l'abaissant, soit, dans des cas beaucoup plus rares, en le relevant. A l'image *IM* se substitue, dans le champ du microscope, une tache lumineuse *IM'* à bords flous, un peu plus grande que *IM*, d'autant plus grande et moins brillante que le condensateur est plus écarté de H_0. On change ainsi les conditions de l'éclairage. Ordinairement c'est tout près de H_0 qu'on trouve les meilleures [1].

Pour observer ou dessiner on déplace *IM'* dans le champ sombre et on éclaire ainsi, successivement, toutes les parties de l'objet, de toutes les manières possibles, comme on explorerait, avec une lampe que l'on tiendrait à la main, une chambre obscure. Le déplacement de *IM'* s'obtient en faisant tourner le miroir. S'il ne s'agit pas de dessiner, mais d'observer seulement, il revient au même de laisser *IM'* immobile et de déplacer la préparation avec les vis de translation de la platine.

Que le déplacement de *IM'* soit absolu ou relatif, il est nécessaire. Ce n'est pas toujours, en effet, dans la zone centrale de *IM'* que l'on voit le mieux les détails. Certains caractères, à cause de leur nature, ou parce qu'ils sont situés d'une manière défavorable, doivent être éclairés obliquement. Il faut placer leur image près du bord de *IM'*, en un point qui n'est pas toujours quelconque, car un azimuth n'en vaut pas toujours un autre, et même, quelquefois, le placer au delà de ce bord, dans la zone peu éclairée.

Le dispositif d'éclairage et le procédé d'observation que je viens de décrire n'ont certainement rien d'original ni de nouveau, mais je ne crois pas qu'ils soient fréquemment employés, aujourd'hui, par les naturalistes qui étudient la morphologie des très petits Arthropodes. Leur but est d'obtenir à la fois, en chaque point de l'objet que l'on regarde à fort grossissement, une grande ouverture numérique des rayons qui servent à éclairer, une grande diversité dans les manières dont on peut faire atteindre ce point par ces rayons, et une grande souplesse dans les changements d'intensité et de convergence de l'éclairage. En outre, dans les régions du champ que l'on ne regarde pas, afin que notre rétine reste sensible au plus haut degré, la plus grande économie de lumière est faite.

Si l'on a besoin d'éclairer le champ d'une façon moins inégale et moins convergente, on centre *IM'* et on abaisse franchement le condensateur.

néité des lames, cette limite est d'environ 1.400 μ. La profondeur de la concavité peut donc aller jusqu'à 1 mm. Un condensateur achromatique de même ouverture exigerait des lames spéciales, de moitié plus minces, et la profondeur de la concavité ne pourrait guère dépasser 300 μ.

1. Un liquide d'immersion, introduit entre le condensateur et la lame porte-objet, augmenterait beaucoup la convergence de l'éclairage. C'est une précaution excellente, nécessaire dans certaines observations délicates, mais elle est incommode et je ne l'emploie pas dans le travail courant.

III. Conservation et mise en collection

Monter à titre permanent, par des opérations qui ne soient pas trop compliquées, ni trop longues, les petits Anthropodes, ou certaines de leurs parties, dans ce que l'on appelle des préparations microscopiques, c'est-à-dire entre lame et lamelle, le milieu de montage étant fermé, conservateur et optiquement favorable, est un problème qui n'a trouvé jusqu'ici aucune solution vraiment bonne. De plus, et c'est un défaut extrêmement grave, l'objet ainsi préparé n'est pas libre. Les renseignements qu'il donne (s'il en donne encore, car les vieilles préparations, très altérées ou écrasées, ne laissent fréquemment plus rien voir) sont incontrôlables puisque l'objet ne se montre à nous que dans une seule direction. Ils ne m'ont jamais suffi. Pour tirer parti d'une préparation j'ai toujours dû la démonter. C'est pourquoi je me permets de dire, en ce qui concerne l'Acarologie, que cette science progresserait beaucoup mieux si l'usage de collectionner les Acariens sous forme de préparations était abandonné.

Les préparations entre lame et lamelle sont indispensables, mais seulement pour l'étude, et il faut alors qu'elles soient ouvertes, comme celles dont il est question dans cette note. Elles sont par conséquent temporaires.

Pour conserver les très petits Arthropodes, Acariens ou autres, le plus simplement et le plus pratiquement possible, il suffit de les mettre dans l'alcool éthylique à 75°, en tubes. La conservation est excellente pourvu que le mélange d'alcool et d'eau distillée soit pur (aucune espèce de dénaturant ne doit être admise) et que le volume des objets conservés, comparé à celui du conservant, soit extrêmement petit. Chaque tube peut recevoir sans inconvénient des animaux de plusieurs espèces différentes. J'emploie des tubes numérotés ayant 4 cm de hauteur et 1 cm de diamètre externe, en verre assez épais. Leur contenance est 1,6 cm^3.

Outre ce procédé courant je recommande, dans un Muséum par exemple, pour des types, ou pour des exemplaires précieux, la conservation dans l'essence de bois de cèdre non épaissie. Les mêmes tubes de verre peuvent être employés et chaque tube peut contenir un grand nombre de spécimens.

Laboratoire de Zoologie du Muséum.